

**SYNTHESE D'UN NOUVEAU PEPTIDE IMMUNOACTIF MARQUE AU CARBONE 14 :**

**L'ACIDE N<sup>2</sup>-[N-[N-LAUROYL-L-ALANYL (<sup>14</sup>C-1)]-γ-D GLUTAMYL]-  
L,L-DIAMINO-2,6-PIMELAMIQUE (RP 56 142 <sup>14</sup>C)**

P. PHAM, J.P. NOEL, J.P. BEAUCOURT et A. VANHOVE

Service des Molécules Marquées  
Département de Biologie  
Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay  
91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

D. PACOT, J. BOUCHAUDON

RHONE-POULENC SANTE  
Centre de Recherches  
94403 Vitry-sur-Seine Cedex, France

**RESUME**

La synthèse du peptide immunoactif RP 56 142 <sup>14</sup>C a été réalisée par synthèse peptidique en solution à partir de L-alanine (<sup>14</sup>C-1) d'activité spécifique 52,5 mCi/mmol (1,94 GBq/mmol).

**SUMMARY**

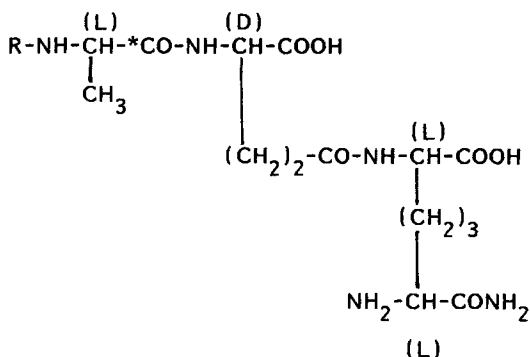
The <sup>14</sup>C labelled immunostimulant peptide RP 56 142 <sup>14</sup>C was synthesized by peptide synthesis in solution using L-(1-<sup>14</sup>C)-alanine of high specific radioactivity (52.5 mCi/mmol ; 1.94 GBq/mmol).

**Key words :** <sup>14</sup>C labelled peptides, peptide synthesis, immunostimulant, RP 56 142.

**INTRODUCTION**

Le tripeptide RP 56 142 N-lauroylé en position terminale 2 est représentatif d'une nouvelle famille d'adjuvants immunologiques dépourvus

de groupements glycanes / 1, 2, 3 /. Le dérivé non lauroylé 1 ne présente pas cette activité immunostimulante. Il était donc intéressant de comparer leurs métabolismes. A cet effet, nous les avons synthétisés avec un marquage au carbone 14 en position 1 du résidu alanyl (\*).



1 : R=H-

2 : R=CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CO- (RP 56 142).

## RESULTATS ET DISCUSSION

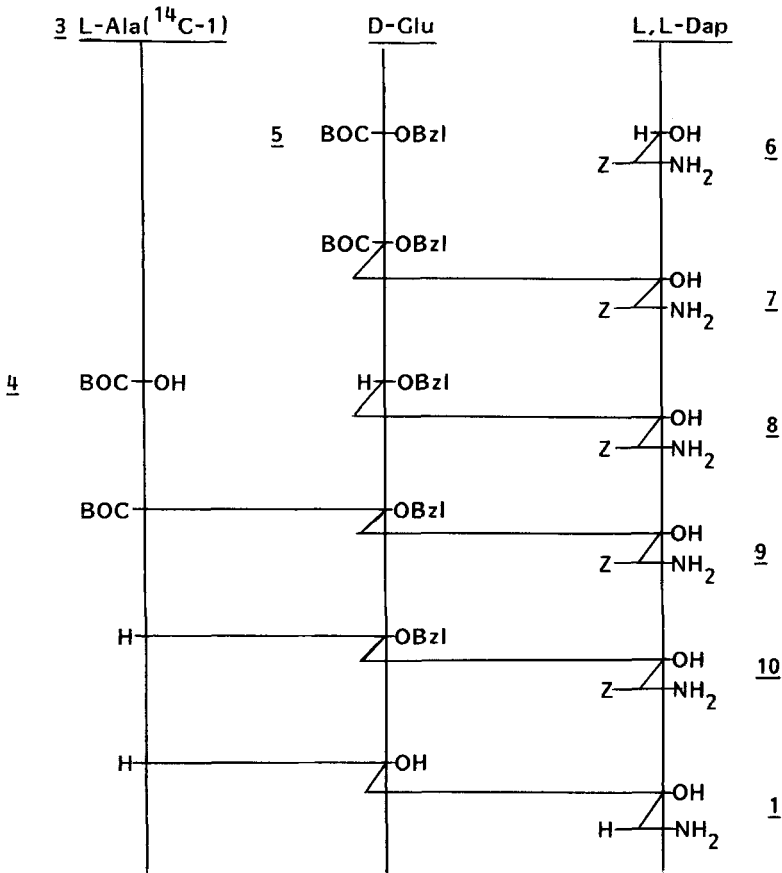
La D,L-alanine (<sup>14</sup>C-1) est synthétisée via l'acide bromo-2 propionique (<sup>14</sup>C-1) selon une méthode connue / 4 /. Son isomère L, 3, est obtenu par résolution enzymatique / 5 /. La L-alanine (<sup>14</sup>C-1), 3, est protégée sur sa fonction amine par le groupement tertibutyloxy-carbonyle (BOC) et ce produit protégé 4 est utilisé dans la synthèse du peptide 1 selon le schéma 1.

L'acide diaminopimélique (Dap) est utilisé sous forme diastéréoisomérique L,L, ce qui permet d'obtenir le peptide 1, plus actif que les peptides synthétisés à partir de Dap racémique / 1, 2, 3 /.

Pour réduire la racémisation de cet acide pendant les réactions de couplage, le groupement carboxylique du Dap est protégé in situ en utilisant du bis(triméthylsilyl)acétamide) (BTMSA) / 3 /.

Le dipeptide 7 a été préparé en condensant BOC-D-Glu-OBzl 5 / 6 / sur le dérivé monobenzyloxycarbonylé de l'acide diamino-2,6 pimélaïque 6 / 3 / par la méthode au chloroformiate d'isobutyle.

Schéma 1



La coupure du groupement BOC a été réalisée avec du dioxane chlorhydrique 2,5 N.

Deux méthodes de couplage ont été testées pour la synthèse de 9 :

- couplage direct de BOC-Ala (<sup>14</sup>C-1) 4 avec le peptide 8, en présence de dicyclohexyl carbodiimide (DCCI) et d'hydroxybenzotriazole (HOBT) (méthode A) ;
- activation de BOC-Ala (<sup>14</sup>C-1) 4 en ester pentafluorophényle actif, puis couplage avec le peptide 8 (méthode B).

Les résultats obtenus avec deux essais traceurs (AS = 3,5 mCi/mmol) montrent que la deuxième méthode permet d'obtenir un meilleur ren-

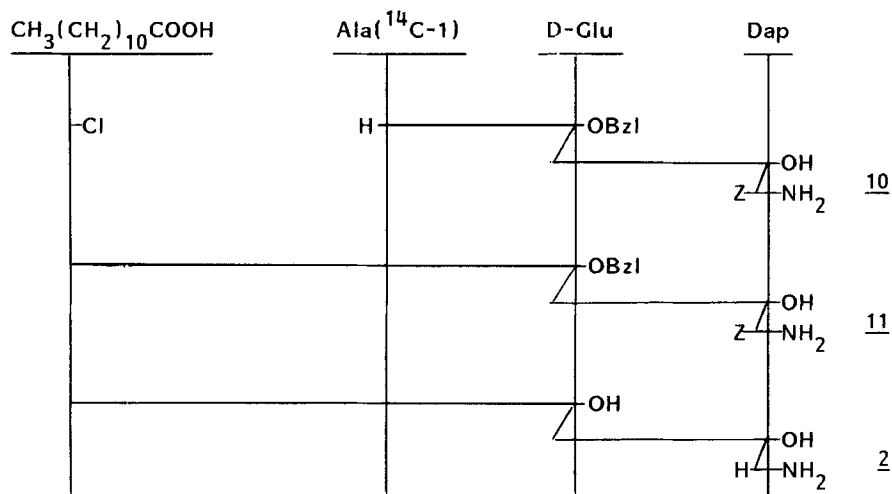
dement : 63 % au lieu de 45 % avec la première méthode et un produit final contenant moins d'impuretés. Par conséquent, la méthode B a été utilisée pour l'essai actif.

La coupure du groupement BOC par traitement de 9 avec une solution de HCl 4N dans le dioxane conduit au tripeptide 10 avec un rendement de 97 %. L'utilisation de l'acide trifluoroacétique donne des rendements plus faibles (72 %) et des produits de réaction plus difficiles à purifier. L'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyle (Z) et ester benzylique (Bzl) de 10 par l'hydrogène en présence de Pd/C 5 % en milieu acide acétique fournit le tripeptide 1 : l'acide N<sup>2</sup>-[N-[L-alanyl-(<sup>14</sup>C-1)]-γ-D-glutamyl]-L,L-diamino-2,6 pimélamique. Cette dernière réaction est très lente (24 heures) et nécessite le renouvellement fréquent du catalyseur.

Après purification par CLHP, on obtient un produit ayant une pureté chimique de 99 % et une activité spécifique de 52,5 mCi/mmol (1,94 GBq/mmol).

Le tripeptide 10 est couplé au chlorure de lauroyle (schéma 2) avec un rendement de 44 %, en utilisant un excès de chlorure d'acide (1,2 à 1,5 équivalents) en présence de N-méthylmorpholine.

### Schéma 2



La variation des paramètres expérimentaux (temps de réaction, température, quantité de N-méthylmorpholine) ne conduit pas à un accroissement du rendement de couplage. L'hydrogénolyse de 11

(Pd/C 5 % milieu acide acétique) est plus facile que celle de 10 et fournit avec un rendement de 95 % (24 heures), le peptide attendu 2 : l'acide N<sup>2</sup>-[N-[N-lauroyl-L-alanyl-(<sup>14</sup>C-1)]-γ-D-glutamyl]-L,L-diamino-2,6-pimélamique.

Après purification par chromatographie liquide sur colonne, 2 est obtenu avec une pureté radiochimique de 99 %, une activité spécifique de 52,5 mCi/mmol (1942 MBq/mmol) et un rendement global de 11 % par rapport à l'alanine (<sup>14</sup>C-1) de départ.

## PARTIE EXPERIMENTALE

Les méthodes utilisées pour la synthèse peptidique en solution sont déjà décrites / 7 /. La mesure de la radioactivité est déterminée par BREMSSTRAHLUNG ou par comptage en scintillation liquide (appareil LKB Wallac, 1211 Rack beta).

La radioactivité spécifique est déterminée à partir du comptage de la radioactivité totale par scintillation liquide et dosage de la concentration à l'aide d'un autoanalyseur d'acides aminés (Biotronik).

L'avancement des réactions est suivi par CCM sur plaques de gel de silice 60-F 254 (Merck) avec lecture de la radioactivité à l'aide d'un scanner Berthold et/ou par autoradiographie, et également par détection des groupements amides en utilisant un spray de chlore-TMD (tétraméthyl diaminodiphénylméthane) / 8 /.

La purification par CLHP est réalisée à l'aide d'un appareil Dupont Preparative HPLC Systems, utilisant une colonne Zorbax ODS (2,12 x 25 cm), un détecteur U.V. à longueur d'onde variable (Dupont) et un détecteur de radioactivité Berthold.

Le contrôle de la pureté chimique et radiochimique est réalisé par plusieurs techniques : CCM sur plaques de gel de silice, CLHP analytique [colonne Zorbax ODS (0,46 x 25 cm), système CLHP de Merck avec détection U.V. à longueur d'onde variable et détection en continu de radioactivité (Berthold)].

L-alanine (<sup>14</sup>C-1) : 3

La D,L-alanine (<sup>14</sup>C-1) est obtenue / 4 / par carbonatation (3 Ci, 111 GBq de Ba<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>), du magnésien CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-MgI puis bromuration et

amination de l'acide obtenu. Le rendement global, après purification sur colonnes échangeuses de cations, est de 70 % d'acide aminé par rapport au carbonate utilisé.

La résolution enzymatique par l'acylase de rein porcin / 5 / permet d'obtenir, après purification sur colonne échangeuse d'ions, la L-alanine ( $^{14}\text{C}$ -1) 3 avec une pureté radiochimique (autoanalyseur et comptage) et une pureté optique (CLHP chirale) supérieures à 99 %, et une radioactivité spécifique de 52,5 mCi/mmol (1,94 GBq/mmol).

t-Butyloxycarbonyl-L-alanine ( $^{14}\text{C}$ -1) : 4

3 (450 mCi, 16,65 GBq, 8,57 mmol), en solution dans 60 ml du mélange eau/dioxane (50/50) est mis en réaction avec le di-tert-butyl dicarbonate  $[(\text{BOC})_2\text{O}]$  (3 équivalents). Après 8 heures d'agitation à température ambiante et maintien du pH à 8 par addition de NaOH 0,1 N, le degré d'avancement de la réaction, suivi par CCM, est de 95 %. L'extraction du mélange réactionnel par l'éther permet d'éliminer l'excès d'anhydride. Après avoir refroidi le mélange à 0°C et abaissé son pH à 3 par de l'acide citrique, on extrait 4 à l'acétate d'éthyle. La purification de cette fraction acétate sur une colonne de silice 60 (3 x 68 cm) en utilisant une élution isocratique avec le mélange acétate d'éthyle/hexane (50/50), permet d'obtenir 367 mCi (13,58 GBq) de 4 (rendement de 81,5 %).

- CCM sur gel de silice :

- .  $R_f = 0,44$  (méthanol/chloroforme : 30/70).
- .  $R_f = 0,62$  (acide acétique à 1 % dans l'acétate d'éthyle).
- .  $R_f = 0,74$  (5 % du mélange n-butanol/acide acétique/eau : 2/1/1 dans l'acétate d'éthyle).

Acide N<sup>2</sup>-(O<sup>1</sup>-benzyl N-tertiobutyloxycarbonyl  $\gamma$ -D-glutamyl) N<sup>6</sup>-benzyl-oxycarbonyl-L,L-diamino-2,6-pimélamique : 7

A une solution refroidie vers -8°C de 800 ml de tétrahydrofurane contenant 21,71 g (64,36 mmol) de 5 et 7,08 ml (64,36 mmol) de N-méthylmorpholine, on ajoute 8,37 ml (64,36 mmol) de chloroformiate d'isobutyle. On agite pendant 20 minutes à -8°C. On ajoute à -8°C une solution contenant 21,91 g (67,75 mmol) de 6 et 200 ml de diméthylformamide en présence de 93,5 ml (381 mmol) de bis-(triméthylsilyl) acétamide. L'agitation est poursuivie pendant 1,5 heure entre -10°C et -2°C, puis 48 heures à température ambiante. Au milieu réactionnel, on ajoute 500 ml d'eau distillée en le maintenant à 20°C. On chasse le tétra-

hydrofuranne par concentration sous vide. La solution obtenue est refroidie vers 5°C et acidifiée par addition de 100 ml d'une solution acide citrique à 10 %. Le précipité blanc formé est filtré, lavé par de l'eau distillée, séché, purifié par chromatographie sur colonne de silice 60 (800 g ; 40-60 µm) avec élution par un mélange d'acétate d'éthyle-acide acétique-eau 200/12/10 (en volumes). On obtient ainsi 28,47 g de 7, soit un rendement de 70 %.

$R_f = 0,57$  (CCM silice 60, acétate d'éthyle/acide acétique/eau : 180/12/10).

Acide N<sup>2</sup>-(O<sup>1</sup>-benzyl-γ-D-glutamyl)-N<sup>6</sup>-benzyloxycarbonyl-L,L-diamino-2,6-pimélamique : 8

28,4 g de 7 sont traités par 600 ml d'acide chlorhydrique 2,5 N dans du dioxane anhydre pendant 1 heure. Le milieu réactionnel est alors concentré à sec et trituré par du diéthyléther. On obtient ainsi 25,4 g de 8, soit un rendement de 99 %.

$R_f : 0,65$  (CCM silice 60, acétate d'éthyle/acide acétique/eau : 40/12/10).

Acide N<sup>2</sup>-(O<sup>1</sup>-benzyl N-(tertiobutyloxycarbonyl-L-alanyl (<sup>14</sup>C-1))-γ-D-glutamyl)-N<sup>6</sup>-benzyloxycarbonyl-L,L-diamino-2,6-pimélamique : 9

#### a) Méthode A : essai traceur

A une solution refroidie à 4°C de 10 ml d'acétonitrile contenant 3,86 mmol (13,5 mCi, 500 MBq) de 4 et 650 mg (4,2 mmol d'hydroxy-benzotriazole, on ajoute 790 mg (3,83 mmol) de dicyclohexylcarbodiimide et on agite pendant 2 heures. On ajoute ensuite à 4°C, une solution contenant 3,8 mmol d'acide N<sup>2</sup>-(O<sup>1</sup>-benzyl-γ-D-glutamyl)-N<sup>6</sup>-benzyloxycarbonyl-L,L-diamino-2,6 pimélamique, 8, 3,8 mmol de N-méthylmorpholine et 15 ml d'acétonitrile en présence de 3,8 ml de bis-(triméthylsilyl) acétamide (BTMSA). L'agitation est poursuivie pendant 2 heures à 4°C puis 15 heures à température ambiante.

Le rendement en produit brut, contrôlé par CCM, est d'environ 45 %. Après deux purifications par chromatographie sur colonne (3 x 30 cm) de silice 60, élution avec un gradient (5-70 %) du mélange BAW (n-butanol/ acide acétique/eau : 2/1/1) dans l'acétate d'éthyle puis par chromatographie liquide (colonne Jobin-Yvon Ø 40 mm, 200 g de silice 60 Merck, 15-40 µm, élution isocratique avec le mélange acide acétique 5 % dans l'acétate d'éthyle), on obtient 1,3 mmol de 9 pur, soit un rendement de 33,7 %.

b) Méthode B : essai traceur

On ajoute à une solution de 3,65 mmol (12,8 mCi, 474 MBq) de 4 dans 10 ml d'acétate d'éthyle sec, 770 mg (4,2 mmol) de pentafluorophénol. Cette solution est refroidie à 0°C et on ajoute 860 mg (4,2 mmol) de DCCI. Après 1 heure d'agitation à 0°C et 2 heures à 20°C, le contrôle CCM indique un rendement de 97 % en ester actif. Après purification par filtration et triturations, on ajoute ce produit à une solution de 8 (3,58 mmol) en présence de 4 mmol de N-méthylmorpholine (NMM), 3,8 ml de BTMSA, 26 ml d'acétonitrile et 5 ml de diméthylformamide. Après 1 heure d'agitation à 0°C on ajoute encore 4 mmol de NMM et l'agitation est poursuivie 1 heure à 0°C et 2 heures à 20°C. Le contrôle par CCM indique que le rendement en 9 brut est d'environ 63 %. Après purification par chromatographie sur colonne (3 x 42 cm, silice 60, 40-60 µm, élution avec un gradient d'acide acétique 1 à 10 % dans l'acétate d'éthyle), on obtient 1,89 mmol de 9 pur, soit un rendement de 51,8 %.

c) Méthode B : essai actif

On dissout 4 (320 mCi, 11,84 GBq, 6,1 mmol) dans 5 ml d'acétate d'éthyle sec, puis on refroidit la solution à 0°C et on ajoute 1,5 g (8,5 mmol) de pentafluorophénol en solution dans 4 ml d'acétate d'éthyle et 1,6 g (8 mmol) de DCCI dissous dans 6 ml d'acétate d'éthyle. Après 2 heures 30 d'agitation à 0°C, les contrôles par CCM indiquent un rendement de 96 % en ester actif brut. On filtre la dicyclohexylurée formée, concentre le filtrat et le purifie sur une colonne de silice 60 (élution par l'acétate d'éthyle). Le produit purifié est concentré à sec, puis solubilisé dans 10 ml d'acétonitrile et refroidi à 0°C. On ajoute alors un mélange de 7 mmol de 8, 7,2 mmol de NMM et 6 ml de BTMSA en solution dans 15 ml d'acétonitrile et 5 ml de diméthylformamide.

Après 1 heure d'agitation à 0°C, on laisse 15 heures à 4°C puis on concentre à sec le mélange réactionnel et le purifie sur colonne (3 x 39 cm) de silice 60 (15-40 µm) en utilisant un gradient 0-10 % d'acide acétique dans l'acétate d'éthyle. On obtient ainsi 136 mCi (5 GBq, 2,57 mmol) de 9, soit un rendement de 42 % de produit purifié.

Acide N<sup>2</sup>-(O<sup>1</sup>-benzyl N-L-alanyl (<sup>14</sup>C-1)-γ-D-glutamyl)-N<sup>6</sup>-benzyloxy-carbonyl-L,L-diamino-2,6-pimélamique : 10

9 est traité par 30 ml d'acide chlorhydrique 4N dans du dioxane anhydre à 0°C pendant 2 heures. Le produit est alors concentré à sec et



purifié par triturations par le diéthyléther (3x), l'acétate d'éthyle (2x) et l'acide acétique 1 % dans l'acétate d'éthyle. On obtient 134 mCi (4,966 GBq) de chlorhydrate de 10 présentant une seule tache en CCM sur silice 60 dans différents systèmes de solvants :

- 1) acide acétique 10 % dans l'acétate d'éthyle ( $R_f = 0,05$ ).
- 2) acétate d'éthyle/acide acétique/eau : 44/12/10 ( $R_f = 0,27$ ).
- 3) acétate d'éthyle/acide acétique/eau : 22/12/10 ( $R_f = 0,8$ ).

Acide N<sup>2</sup>-(N-L-alanyl(<sup>14</sup>C-1)-γ-D-glutamyl)-L,L-diamino-2,6-pimélamique : 1

L'hydrogénation catalytique en présence d'hydrogène gaz et de Pd/C 5 % d'une solution dans l'acide acétique de 7,3 mCi (270 MBq) de 10 permet d'obtenir 1. Après 20 heures de réaction, en présence de 90 mg de catalyseur, le rendement est seulement de 26 %. Après deux additions supplémentaires de 90 mg de catalyseur et 2 x 2 heures de réaction, on obtient finalement 92 % de 1 brut. La purification par CLHP (colonne ODS 2,2 x 25 cm, éluant TFA 0,1 % dans l'acétonitrile) permet d'obtenir 5,6 mCi (207 MBq, rendement 76,7 %) de 1 présentant une pureté radiochimique de 99 % (CLHP analytique) et une activité spécifique de 52,5 mCi (1,94 GBq) par millimole.

CCM sur silice 60 :

- a) n-butanol/acide acétique/eau : 2/1/1 ( $R_f = 0,14$ ).
- b) acétate d'éthyle/acide acétique/eau : 20/12/10 ( $R_f = 0,23$ ).

CLHP : colonne C-18 TSK (4,6 x 250 mm) :

solvant : acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique : 20/80/0,1.

Ce peptide libre 1 se conserve mal en solution (1 mCi/ml) dans l'acide acétique. Après deux semaines de conservation dans ce milieu, la pureté de 1 n'est plus que de 97,5 %. Une repurification de 1 par CLHP a été nécessaire pour obtenir un produit dont la pureté radiochimique est supérieure à 99,5 %. 1 est alors lyophilisé et conservé à -30°C.

Acide N<sup>2</sup>-(O<sup>1</sup>-benzyl-N-(N-lauroyl-L-alanyl(<sup>14</sup>C-1))-γ-D-glutamyl)-N<sup>6</sup>-benzyloxycarbonyl-L,L-diamino-2,6-pimélamique : 11

Une solution de 10 (120 mCi, 4,44 GBq, 2,28 mmol) dans 10 ml de diméthylformamide fraîchement distillé est refroidie à -10°C. On y ajoute

1,5 ml (6,3 mmol) de BTMSA puis 1 ml (4,4 mmol) de chlorure de lauroyle et 0,4 ml (3,56 mmol) de NMM.

L'agitation magnétique est maintenue pendant 1 heure à  $-10^{\circ}\text{C}$ , puis 3 heures à  $4^{\circ}\text{C}$  et 1 heure à  $20^{\circ}\text{C}$ . Le contrôle par CCM indique un degré d'avancement de 55 %. Après évaporation à sec, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice 60 (15-40  $\mu\text{m}$ ) en utilisant comme éluant un gradient de 1 à 10 % d'acide acétique dans l'acétate d'éthyle. On obtient 52,5 mCi (1,94 GBq) de 11 avec une pureté de 98 % environ (rendement 44 %).

Acide  $\text{N}^2$ -(N-(N-lauroyl-L-alanyl( $^{14}\text{C}$ -1)))- $\gamma$ -D-glutamyl-L,L-diamino-2,6-pimélamique : 2 (RP 56 142  $^{14}\text{C}$ )

11, concentré à sec, est dissous dans 100 ml d'acide acétique glacial. On ajoute 660 mg de Pd/C 5 %. Un bullage d'hydrogène est assuré sous agitation magnétique pendant 2 heures à  $20^{\circ}\text{C}$ . Le contrôle par CCM indique que la réaction est quasi totale. Le mélange est alors filtré sur Millipore LS et le produit est concentré à sec, puis trituré par l'acétate d'éthyle. Le résidu est redissous dans un mélange aqueux d'acide acétique 55 % et purifié par chromatographie sur colonne (3 x 40 cm) de silice 60 (15-40  $\mu\text{m}$ ). 2 élué par le mélange acétate d'éthyle/acide acétique/eau : 80/12/10, présente une pureté radiochimique de 99 %. La radioactivité totale obtenue est de 45,5 mCi (1,68 GBq), soit un rendement de 86,7 % par rapport à 11, ou un rendement global de 2 d'environ 11 % par rapport à la L-alanine ( $^{14}\text{C}$ -1) 3.

CCM sur silice 60 :

- a) n-butanol/acide acétique/eau : 2/1/1 ( $R_f = 0,65$ ).
- b) acétate d'éthyle/acide acétique/eau : 40/12/10 ( $R_f = 0,34$ ).
- c) acétate d'éthyle/acide acétique/eau : 20/12/20 ( $R_f = 0,86$ ).

CLHP : colonne ODS sup RS (4,6 x 250 mm) :

solvant : acétonitrile/sulfate de sodium 0,025 M : 30/70  
( $V_R = 18,54$  ml).

## REFERENCES

- / 1 / J. Bouchaudon, G. Dutruc-Rosset, D. Farge et C. James  
"Second Forum on Peptides", Eds. A. Aubry, M. Marraud,

B. Vitoux. Colloque INSERM/John Libbey Eutoext Ltd, 1989,  
Vol. 174, p. 257.

- / 2 / F. Floc'h, J. Bouchaudon, C. Fizames, A. Zerial,  
G. Dutruc-Rosset et G.H. Werner  
Drugs of the Future, 9, 763 (1984).
- / 3 / J. Bouchaudon, G. Dutruc-Rosset, D. Farge et C. James  
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1989, 695.
- / 4 / A. Murray et D.L. Williams  
"Organic Synthesis with Isotopes".  
Interscience Pub., NY, London, 1958, p. 164.
- / 5 / Y.P. Greenstein et M. Winitz  
"Chemistry of the Amino Acids", John Wiley & Sons Inc.,  
NY, London, 1961, vol. 3, p. 1831.
- / 6 / G.H.L. Nefkens et R.H.F. Nivard  
Rec. Trav. Chim., 83, 199 (1964).
- / 7 / Houben-Weyl  
"Methoden der organischen Chemie, Band 15 : Synthese  
von Peptiden".  
Pub. Georg. Thieme Verlag, Stuttgart, 1974.
- / 8 / E. Von Arx, M. Faugel et M. Brugger  
J. Chromatog., 120, 224 (1976).